

# Cry1A 毒素与二化螟中肠刷状缘膜囊泡受体蛋白配基结合分析

徐永桂, 杨亦桦, 吴益东\*

(南京农业大学植物保护学院, 农业部作物病虫害监测与防控重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要:** 分离和鉴定二化螟 *Chilo suppressalis* 幼虫中肠刷状缘膜囊泡(BBMV)中 Cry1A 毒素的受体蛋白, 对于阐明 Cry1A 毒素作用机理和二化螟抗性机理具有十分重要的意义。为此, 本文就 Cry1A 毒素对二化螟杀虫活性及 Cry1Ac 与二化螟中肠受体的配基结合进行了研究。结果表明: Cry1Ab 对二化螟室内品系(CN)的毒力高于 Cry1Ac, 而 Cry1Ac 高于 Cry1Aa。配基结合分析表明二化螟 CN 品系幼虫中肠 BBMV 中有 6 个 Cry1Ac 结合蛋白(分子量分别为 50, 70, 90, 120, 160 和 180 kDa), 其中 180, 160 和 90 kDa 结合蛋白的条带颜色明显深于其他结合蛋白的条带, 表明这 3 个受体蛋白具有较高的结合浓度。同源竞争结合研究表明, 180 和 90 kDa 结合蛋白为 Cry1Ac 的低亲合性结合蛋白, 其他 4 个为高亲合性结合蛋白。为了研究 Cry1Ac 和 Cry1Ab 受体结合部位的相互作用, 进行了异源竞争结合研究。Cry1Ab 可以与 Cry1Ac 所有的 6 个结合蛋白进行竞争性结合, 与 180, 120, 70 和 50 kDa 结合蛋白具有高亲合性, 而与 160 和 90 kDa 结合蛋白具有低亲合性。结果显示, Cry1Ac 与 Cry1Ab 在二化螟幼虫中肠 BBMV 上拥有多个共享的结合位点, 但对每个结合位点的亲合性有差异。基于毒素结合部位的相似性, Cry1Ac 和 Cry1Ab 不宜同时用于转基因 Bt 水稻来控制二化螟。

**关键词:** 二化螟; 刷状缘膜囊泡; 苏云金杆菌; Cry1A; 配基印迹

中图分类号: Q965.9 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2009)02-153-06

## Ligand blot analysis of Bt Cry1A toxin binding with the midgut brush border membrane vesicle receptors of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

XU Yong-Gui, YANG Yi-Hua, WU Yi-Dong\* (Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects of the Ministry of Agriculture, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Isolation and identification of the binding proteins of Cry1A toxins in the midgut brush border membrane vesicles (BBMV) of *Chilo suppressalis* is very important for understanding the mode of action and resistance mechanism of Cry1A toxins. In the present study, insecticidal activity and ligand binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins to the midgut BBMVs of striped rice stem borer *C. suppressalis* were investigated. The results indicated that Cry1Ab was more toxic than Cry1Ac, and Cry1Ac was more toxic than Cry1Aa against the 3rd instar larvae of the laboratory strain (CN) of *C. suppressalis*. Ligand blot analysis showed that there were six major proteins (50, 70, 90, 120, 160 and 180 kDa) binding to Cry1Ac in the midgut BBMVs of the CN strain. Bands of 180, 160 and 90 kDa binding proteins were much darker than the others, suggesting that these proteins had higher binding concentrations. Results of homologous competition binding indicated that the 180 and 90 kDa protein bands were of low binding affinity, while the other four protein bands (160, 120, 70 and 50 kDa) were of high binding affinity. Heterologous competition binding assays were conducted to study cross-reactivity of the binding sites between Cry1Ab and Cry1Ac. Cry1Ab competed for all binding sites recognized by Cry1Ac, with high affinity to 180, 120, 70 and 50 kDa proteins and low affinity to 160 and 90 kDa proteins. These data suggest that Cry1Ac and Cry1Ab share several common binding sites in the midgut BBMVs of *C. suppressalis*, but they have different

基金项目: 国家“973”计划项目(2007CB109204)

作者简介: 徐永桂, 男, 1982 年生, 安徽滁州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分子毒理学, E-mail: xuyg820116@163.com

\* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: wyd@njau.edu.cn

收稿日期 Received: 2008-08-27; 接受日期 Accepted: 2008-12-31

binding affinity with respect to each binding site. Considering the similarity in binding sites, Cry1Ab and Cry1Ac should not be used simultaneously in the transgenic Bt rice to control the target pest *C. suppressalis*.

**Key words:** *Chilo suppressalis*; brush border membrane vesicle (BBMV); *Bacillus thuringiensis*; Cry1A; ligand blot

苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* (Bt) 自 20 世纪 50 年代始广泛应用于害虫防治, 由于其卓越的杀虫效果和对哺乳动物的安全性, 它一直是世界上产量最大、应用最广的生物农药。这种革兰氏阳性杆菌在形成芽孢时, 可同时产生对昆虫具有毒杀作用的伴孢晶体, 这种伴孢晶体通常被称为  $\delta$ -内毒素 ( $\delta$ -endotoxin)、杀虫晶体蛋白 (ICP) 或 Cry 毒素。目前, 已有超过 200 个 Cry 毒素基因被克隆和测序, 并对一些基因进行了人工修饰和改造, 使其杀虫活性更高; 同时, Bt 毒素 Cry 基因已被转入到棉花、玉米、大豆、水稻等多种作物中, Bt 转基因抗虫作物 (主要为棉花、玉米) 已在世界范围内得到大面积应用, 产生了极其显著的经济、社会和生态效益 (James, 2007)。

Bt 杀虫晶体蛋白的分子量为 70 ~ 140 kDa, 通常称为原毒素 (protoxin), 昆虫食入原毒素后, 在昆虫中肠的高 pH 环境和蛋白水解酶的作用下, 原毒素被激活为分子量为 60 ~ 70 kDa 左右的毒性多肽, 活化的毒性多肽与昆虫中肠上皮细胞刷状缘膜囊泡 (brush border membrane vesicles, BBMV) 上的特异受体结合, 在细胞膜上形成跨膜离子通道, 破坏中肠细胞膜的渗透性, 引起昆虫中肠上皮细胞的裂解和昆虫死亡 (Hofmann *et al.*, 1988; Gill *et al.*, 1992; Bravo *et al.*, 2007)。

Cry 毒素与昆虫中肠 BBMV 上特异性受体的结合是决定 Cry 毒素杀虫谱的关键因素。鳞翅目昆虫中肠 BBMV 上存在多种 Cry 毒素的受体蛋白, 包括氨肽酶类 (APNs), 钙粘蛋白类 (cadherins), 碱性磷酸酯酶 (ALP) 和糖酯类 (glycolipid) 等, 其中最重要的两类为氨肽酶类和钙粘蛋白类受体。在烟草天蛾 *Manduca sexta*, 家蚕 *Bombyx mori* 和烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 上, 钙粘蛋白已被证实为 Cry1A 毒素的功能受体 (Vadlamudi *et al.*, 1995; Tsuda *et al.*, 2003; Jurat-Fuentes and Adang, 2006)。许多研究也表明氨肽酶能够与 Cry1A 毒素结合 (Knight *et al.*, 1994; Sangadala *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1996; Valaitis *et al.*, 1997; Gill and Ella, 2002; Rajagopal *et al.*, 2002)。关于 Cry1A 毒素与鳞翅目昆虫中肠受体互作的分子机理, 目前有两种模型: Bravo 模型

和 Zhang 模型 (Pigott and Ellar, 2007)。Bravo 模型认为 Cry1A 活化毒素首先在第一种受体 (钙粘蛋白) 的介导下寡聚化形成四聚体, 四聚体再与第二种受体 (氨肽酶或其他类型) 结合后插入中肠形成孔道, 从而导致昆虫死亡。Zhang 模型则认为 Cry1A 毒素与钙粘蛋白结合后激发 adenylyl cyclase/PKA 信号通路, 引起昆虫中肠细胞凋亡, 从而导致昆虫死亡 (Zhang *et al.*, 2006)。在两种模型中, 钙粘蛋白受体均发挥了关键性作用。

二化螟 *Chilo suppressalis* Walker 是我国重要的水稻害虫。长期以来频繁使用化学农药, 如杀虫单 (双)、三唑磷、氟虫腈、阿维菌素等化学农药防治二化螟, 每年仍然造成 3.1% 的水稻产量损失 (盛承发等, 2003), 杀虫剂的大量使用也带来了抗药性问题 (李秀峰等, 2001; 姜卫华等, 2005)。转基因 Bt 水稻的研发成功为水稻螟虫的控制提供了经济、安全、高效的新途径。Cry1Ab 和 Cry1Ac 是转基因 Bt 水稻中最常用的基因, 一旦转基因 Bt 水稻大面积推广应用, 靶标害虫对 Bt 毒素的抗性风险问题将不可回避。本文对 Cry1A 毒素对二化螟杀虫活性及 Cry1Ac 与二化螟中肠受体的配基结合进行了研究, 以期对 Cry1A 毒素的杀虫机理研究和转基因 Bt 水稻的抗性治理提供一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

二化螟苍南 (CN) 品系为 2002 年采自浙江苍南, 在室内连续饲养至今, 未接触任何化学农药或 Bt 毒素制剂。室内饲养参照尚稚珍等 (1979) 的方法。饲养条件为:  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相对湿度大于 80%, 光照周期为 16L:8D, 光照强度为 1 500 ~ 2 000 lx。

### 1.2 主要试剂

Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac 均为活化毒素, 由法国 CIRAD 实验室提供; SuperSignal<sup>®</sup> West Pico 化学发光检测底物、NHS-LC-biotin 生物素标记试剂、Streptavidin-HRP 均购自 PIERCE 公司; PVDF 膜购自南京生兴试剂公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 毒力测定

将二化螟人工饲料切成 3 mm 厚的薄片,然后打成圆片状放入 24 孔培养板中,将其压实(饲料与培养板间无空隙),然后将孔口、孔壁饲料清理干净;用 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)将毒素稀释成 5 个不同浓度,每孔加入 100  $\mu$ L 的活化毒素溶液于饲料表面,在室温下晾干;每孔接入 1 头 3 龄幼虫,每个浓度处理 24 头,重复两次;置于  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  下,5 d 后检查结果。完全死亡或生长发育受到严重抑制(体色深黑皱缩或体长不到对照体长一半)都作为死亡,根据死亡几率值法计算毒力回归线和  $\text{LC}_{50}$ 。

1.4 二化螟中肠 BBMV 的制备

参照 Wolferberger 等(1987)的 Mg-EGTA 沉降法。取二化螟 5 龄末或 6 龄初幼虫 80 头,解剖取出中肠,加入 2 mL 匀浆缓冲液(17 mmol/L Tris pH 7.5,300 mmol/L 甘露醇,5 mmol/L EGTA,用前加 20  $\mu$ L 1% PMSF)反复研磨 5 次,每次 1 min;加入 3 mL 24 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  后混匀,冰浴 30 min;2 500 g,  $4^\circ\text{C}$  离心 10 min;将上清液在 30 000 g  $4^\circ\text{C}$  离心 30 min;弃上清,将沉淀重悬于 300  $\mu$ L HEPES 缓冲液(10 mmol/L HEPES,130 mmol/L KCl,10% 甘油,pH 7.4),分装后置于  $-80^\circ\text{C}$  贮存备用。

采用 SDS-PAGE 电泳检测 BBMV 和 Bt 毒素蛋白的质量。分离胶浓度为 8% 和浓缩胶浓度为 5%,染色用 0.025% 的考马斯亮蓝 R250 (40% 乙醇 + 7% 乙酸),脱色液 1 为 50% 乙醇 + 10% 乙酸,脱色液 2 为 5% 乙醇 + 7% 乙酸。蛋白质含量测定参照 Bradford(1976)的方法。

1.5 Cry1A 毒素的生物素(biotin)标记

参照 PIERCE 公司试剂盒说明书。先将 1 mL Cry1Aa, Cry1Ab 或 Cry1Ac 活化毒素溶液(2 mg/mL)置于 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)透析过夜( $4^\circ\text{C}$ ),然后将 31  $\mu$ L NHS-LC-biotin 溶液(10 mmol/L)和透析处理过的 1 mL Cry1A 毒素溶液混合,室温下反应 1 h 后置于 0.01 mol/L PBS (pH 7.4)透析过夜( $4^\circ\text{C}$ ),再加入 1 mL 丙三醇,分装后置于  $-20^\circ\text{C}$  贮存备用。

1.6 Cry1A 毒素与受体的配基结合

取制备的二化螟 BBMV 悬浮液 10  $\mu$ L 与 10  $\mu$ L 上样缓冲液混合, $95^\circ\text{C}$  变性 5 min 后上样。SDS-PAGE 电泳后依次进行下列操作。(1)转膜:采用半干转移系统将 PAGE 胶上的蛋白转印到 PVDF 膜上;(2)封闭:将 PVDF 膜在 TBST-BSA(2.5%)中封闭 4 h;(3)杂交:将 PVDF 膜转入 TBST-biotin-Cry1Ac (1:5 000)中缓慢振荡过夜( $4^\circ\text{C}$ );(4)显色

和成像:PVDF 膜置于 TBST-streptavidin-HRP (1:10 000)中温育 4 h,然后放入显色工作液(显色液与增强液以 1:1 的比例混合)中温育 5 min,用 Bio-Rad Versa Doc 化学发光凝胶成像系统拍摄。

Cry1Ac 毒素同 BBMV 同源竞争结合:在上述杂交步骤中加入 5 倍于生物素标记 Cry1Ac 的未标记 Cry1Ac 活化毒素作为竞争抑制剂(Cry1Ac:biotinylated Cry1Ac = 5:1)进行同源竞争,其他步骤同上。

Cry1Ab 毒素同 BBMV 异源竞争结合:在上述杂交步骤中加入 5 倍于生物素标记 Cry1Ac 的未标记 Cry1Ab 活化毒素作为竞争抑制剂(Cry1Ab:biotinylated Cry1Ac = 5:1)进行异源竞争,其他步骤同上。

2 结果与分析

2.1 3 种 Cry1A 毒素对二化螟的毒力

用 Cry1Aa, Cry1Ab 和 Cry1Ac 活化毒素对二化螟 CN 品系进行生物测定,Cry1Ab 对二化螟的毒力最高,其次是 Cry1Ac, Cry1Aa 的毒力最低(表 1)。

表 1 3 种 Cry1A 毒素对二化螟的毒力

Table 1 Toxicity of three Cry1A toxins to <i>Chilo suppressalis</i>		
Bt 毒素	毒力回归方程	$\text{LC}_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Bt toxin	LD-P line	(95% CL)
Cry1Aa	$y = 5.010 + 1.081x$	0.49(0.33 - 0.88)
Cry1Ab	$y = 5.565 + 1.025x$	0.14(0.06 - 0.23)
Cry1Ac	$y = 5.145 + 1.120x$	0.37(0.26 - 0.59)

2.2 SDS-PAGE 电泳检测 Cry1A 毒素蛋白和二化螟中肠 BBMV 蛋白

为了保证配基结合实验的成功,首先对生物素标记的 Cry1A 活化毒素与制备的二化螟中肠 BBMV 蛋白的质量进行 SDS-PAGE 电泳检测。由图 1 可见,生物素标记的 Cry1Aa 和 Cry1Ab 毒素蛋白在 60 kDa 左右处均有单一清晰条带(Cry1Aa 和 Cry1Ab 活化毒素均经 HPLC 纯化),Cry1Ac 毒素蛋白在 60 kDa 左右处也有一明显条带(该毒素未经 HPLC 纯化,因而出现一些微弱的杂带)。二化螟中肠 BBMV 蛋白条带清晰,分布均匀,表明所制备的二化螟 BBMV 蛋白质量很好。

2.3 Cry1A 毒素与二化螟中肠 BBMV 配基结合

为了研究二化螟中肠 BBMV 中能与 Cry1Ac 结

合的受体蛋白数量及分子量大小,采用生物素标记的 Cry1Ac 毒素进行配基结合实验,结果如图 2 所示。二化螟幼虫中肠 BBMVs 中具有 6 个 Cry1Ac 毒素结合蛋白,分子量分别为 180,160,120,90,70 和 50 kDa (图 2: 泳道 2 和 3),其中 180,160 和 90 kDa 结合蛋白的条带明显深于其他结合条带,表明这 3 个毒素结合蛋白与 Cry1Ac 具有较高的结合浓度。

以 5 倍未标记的 Cry1Ac 与生物素标记的 Cry1Ac 进行同源竞争配基结合试验,结果如图 2 泳

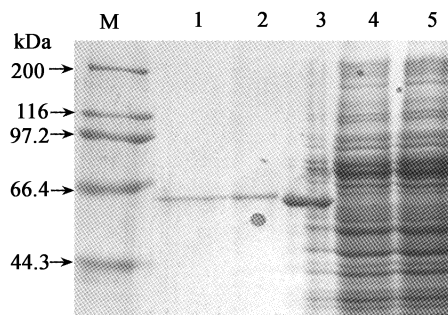


图 1 SDS-PAGE 电泳检测 Cry1A 毒素和二化螟中肠 BBMVs 蛋白的质量

Fig. 1 Quality examination of Cry1A toxins and BBMVs proteins from *Chilo suppressalis* midgut by SDS-PAGE

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1-3: 分别为生物素标记的 Cry1Aa, Cry1Ab 和 Cry1Ac 毒素 Biotinylated Cry1Aa, Cry1Ab and Cry1Ac, respectively; 4-5: 二化螟中肠 BBMVs 蛋白 BBMVs proteins from *C. suppressalis* midgut.

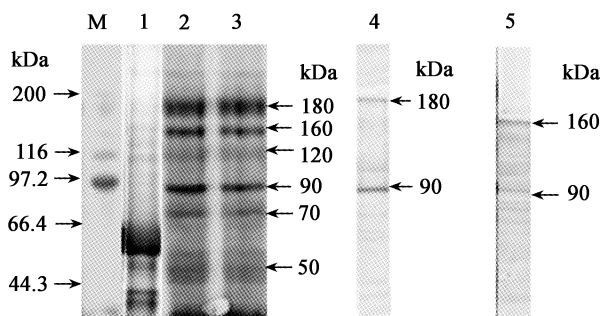


图 2 Cry1A 毒素与二化螟中肠 BBMVs 配基结合

Fig. 2 Ligand blotting of biotinylated Cry1A with the midgut BBMVs of *Chilo suppressalis*

M: 蛋白质分子量标准 Protein molecular weight marker; 1: 生物素标记的 Cry1Ac 毒素 Biotinylated Cry1Ac; 2-3: 生物素标记的 Cry1Ac 与 BBMVs 的配基结合 Ligand blot of biotinylated Cry1Ac with BBMVs; 4: 生物素标记的 Cry1Ac + 5 倍未标记 Cry1Ac 与 BBMVs 的配基结合 Ligand blot of biotinylated Cry1Ac with BBMVs in the presence of 5-fold unlabeled-Cry1Ac; 5: 生物素标记的 Cry1Ac + 5 倍未标记 Cry1Ab 与 BBMVs 的配基结合 Ligand blot of biotinylated Cry1Ac with BBMVs in the presence of 5-fold unlabeled Cry1Ab.

道 4 所示。180 和 90 kDa 毒素结合蛋白在竞争结合后能被检测到,但结合量明显降低,而 160,120,70 和 50 kDa 毒素结合蛋白被完全竞争抑制,该结果表明 180 和 90 kDa 两个蛋白是 Cry1Ac 的低亲合性结合蛋白,而同其他 4 个为高亲合性结合蛋白。

为了研究 Cry1Ac 和 Cry1Ab 受体结合部位的相互作用,以 5 倍未标记的 Cry1Ab 与生物素标记的 Cry1Ac 进行异源竞争配基结合试验,结果如图 2 泳道 5 所示。Cry1Ab 可以与 Cry1Ac 所识别的 6 个结合蛋白进行竞争性结合,与 180,120,70 和 50 kDa 结合蛋白具有高亲合性,而与 160 和 90 kDa 结合蛋白具有低亲合性。上述结果表明,Cry1Ac 与 Cry1Ab 在二化螟幼虫中肠 BBMVs 上拥有多个共享的结合位点,但对每个结合位点的亲合性有差异。

### 3 讨论

Fiuza 等 (1996) 采用与本研究相近的毒素涂表法测定了 Cry1Aa, Cry1Ab 和 Cry1Ac 活化毒素对来自法国的一个二化螟种群的毒力,发现 Cry1Aa 的毒力 ( $LC_{50} = 1.69 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 略高于 Cry1Ac ( $LC_{50} = 2.24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ )。Lee 等 (1997) 采用饲料混毒法对来自菲律宾国际水稻研究所的一个二化螟种群进行毒力测定表明,Cry1Ac 的毒力比 Cry1Aa 高 5 倍。来自中国水稻主产区不同二化螟地理种群对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 的敏感性具有 10 ~ 15 倍的差异 (Meng *et al.*, 2003)。以上研究结果表明,地理种群和生物测定方法可以影响二化螟对 Cry1A 毒素的敏感性,在进行抗性监测时要充分考虑这些因素。

Fiuza 等 (1996) 报道,Cry1Aa, Cry1Ac 和 Cry1Ba 与二化螟幼虫中肠 BBMVs 都可以进行饱和结合,表明每种毒素至少具有 1 个特异性结合位点;竞争性结合试验表明 Cry1Ac 和 Cry1Ba 具有一个共同的结合位点,而该位点也是 Cry1Aa 的低亲合性结合位点。Lee 等 (1997) 研究发现, Cry1Aa, Cry1Ac, Cry2A 和 Cry1C 毒素都能同二化螟中肠 BBMVs 进行高度亲合性结合,Cry1Aa 和 Cry1Ac 具有一些相同的结合位点,而与 Cry2A 和 Cry1C 结合位点不同。Alcantara 等 (2004) 研究表明,Cry1Ab 和 Cry1Ac 在二化螟幼虫 BBMVs 上具有共同的结合位点,并具有相似的亲合性。上述研究均采用  $I^{125}$  标记的 Cry 毒素与二化螟中肠 BBMVs 进行直接结合和竞争结合试验,只能通过数量模型对结合位点和亲合性进行推算。本文采用配基印迹方法,可以直观地显示毒

素结合蛋白的数量、分子量大小等重要信息,并结合同源、异源竞争结合,明确表明了 Cry1Ac 与 Cry1Ab 在二化螟幼虫中肠 BBMV 上拥有多个共享的结合位点,但两者对每个结合位点的亲合性具有差异。

昆虫对 Bt 毒素存在有多种抗性机理,其中 Bt 毒素受体基因突变是最主要的抗性机理。在 3 种鳞翅目昆虫中,钙粘蛋白受体的变异与对 Bt 毒素的抗性直接相关。Gahan 等(2001)发现烟芽夜蛾钙粘蛋白基因由于一个逆转录转座子的插入而使钙粘蛋白不能完整表达,从而对 Cry1Ac 产生高水平抗性。Morin 等(2003)报道,棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella* 的钙粘蛋白基因在抗性种群中存在 3 种突变型(有 2 个基因突变为碱基缺失引起,第 3 个为移码突变后提前产生终止密码子)。棉铃虫 Cry1Ac 高抗品系钙粘蛋白基因由于缺失突变导致终止密码子提前,该突变基因编码一个截短的钙粘蛋白,从而丧失了作为 Bt 毒素受体的功能(Xu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006)。一个氨肽酶 N 基因(*APN1*)表达丧失后可以导致甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* 对 Cry1Ca 产生抗性,从而表明 APN1 受体在 Cry1Ca 作用机理中起关键作用(Herrero *et al.*, 2005)。

我国转基因 Bt 水稻的研究和开发已取得显著进展,一些转基因抗虫水稻品系已进入生产性试验阶段(韩兰芝等,2006)。Bt 水稻能有效控制水稻螟虫和稻纵卷叶螟,并可使杀虫剂使用量降低 80%(Huang *et al.*, 2005)。转基因 Bt 水稻品种中转入的抗虫基因多数为 Cry1Ab 或 Cry1Ac,室内筛选试验已证实许多鳞翅目昆虫具备对 Cry1Ab 和 Cry1Ac 产生抗性的潜力(Heckel *et al.*, 2007)。转基因 Bt 水稻品种将来进行商业化种植后,靶标害虫将面临巨大的选择压力,靶标害虫对转基因 Bt 水稻的抗性风险评价和预防性抗性治理对策是目前需要重视的问题。在作物中转入双价抗虫基因是延缓靶标害虫抗性的一个途径,但选用什么基因进行组合是一个值得重视的问题。本文研究发现 Cry1Ac 与 Cry1Ab 在二化螟幼虫中肠 BBMV 上拥有多个共享的结合位点,具有产生交互抗性的风险,因此, Cry1Ac 和 Cry1Ab 不宜同时用于转基因 Bt 水稻来控制二化螟。分离、鉴定二化螟幼虫中肠 BBMV 中 Cry1A 毒素的受体蛋白将有助于搞清 Cry1A 毒素作用机理和抗性机理,从而为靶标害虫抗性治理提供理论依据。

## 参 考 文 献 (References)

Alcantara EP, Aguda RM, Curtiss A, Dean DH, Cohen MB, 2004.

*Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin binding to brush border membrane vesicles of rice stem borers. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 55: 169–177.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–254.

Bravo A, Gill SS, Soberón M, 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423–435.

Fiuzza L, Nielsen-Leroux C, Goze E, Frutos R, Charles J, 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1 544–1 549.

Gahan LJ, Gould F, Heckel DG, 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science*, 293: 857–860.

Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV, 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 615–636.

Gill M, Ellar DJ, 2002. Transgenic *Drosophila* reveals a functional *in vivo* receptor for the *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac1. *Insect Mol. Biol.*, 11: 619–625.

Han LZ, Wu KM, Peng YF, Guo YY, 2006. Research advances in ecological safety of insect-resistant transgenic rice. *Chin. J. Appl. Environ. Biol.*, 12: 431–436. [韩兰芝, 吴孔明, 彭于发, 郭予元, 2006. 转基因抗虫水稻生态安全性研究进展. 应用与环境生物学报, 12: 431–436]

Heckel DG, Gahan LJ, Baxter SW, Zhao JZ, Shelton AM, Gould F, Tabashnik BE, 2007. The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.*, 95: 192–197.

Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA, 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four aminopeptidase N genes. *BMC Genomics*, 6: 96.

Hofmann C, Vanderbruggen H, Hofte H, Van Rie J, Jansens S, Van Mellaert H, 1988. Specificity of Bt delta-endotoxins is correlated with the presence of binding-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7 844–7 848.

Huang JK, Hu RF, Rozelle S, Pray C, 2005. Insect-resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science*, 308: 688–690.

James C, 2007. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007. ISAAA Briefs No. 36. ISAAA: Ithaca, New York.

Jiang WH, Han ZJ, Hao ML, 2005. Primary study on resistance of rice stem borer (*Chilo suppressalis*) to fipronil. *Chin. J. Rice Sci.*, 19: 577–579. [姜卫华, 韩召军, 郝鸣丽, 2005. 二化螟对氟虫腈抗性初探. 中国水稻科学, 19: 577–579]

Jurat-Fuentes JL, Adang MJ, 2006. The *Heliothis virescens* cadherin protein expressed in *Drosophila* S2 cells functions as a receptor for

- Bacillus thuringiensis* Cry1A but not Cry1Fa toxins. *Biochemistry*, 45: 9 688 – 9 695.
- Knight P, Crickmore N, Ellar DJ, 1994. The receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1A (c) delta-endotoxin in the brush border membrane of the Lepidopteran *Manduca sexta* is aminopeptidase N. *Mol. Microbiol.*, 11: 429 – 436.
- Lee MK, Aguda RM, Cohen MB, Gould FL, Dean DH, 1997. Determination of binding of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin receptors to rice stem borer midguts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 1 453 – 1 459.
- Li XF, Han ZJ, Chen CK, Li GQ, Wang YC, 2001. Monitoring for resistance of rice stem borer (*Chilo suppressalis* Walker) to 4 conventional insecticides. *J. Nanjing Agric. Univ.*, 24: 43 – 46. [李秀峰, 韩召军, 陈长琨, 李国清, 王荫长, 2001. 二化螟对杀虫单等4种杀虫剂的抗药性. 南京农业大学学报, 24: 43 – 46]
- Luo K, Lu YJ, Adang MJ, 1996. A 106-kDa form of aminopeptidase is a receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1C endotoxin in the brush border membrane of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 783 – 791.
- Meng FX, Wu KM, Gao XW, Peng YF, Guo YY, 2003. Geographic variation in susceptibility of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins in China. *J. Econ. Entomol.*, 96: 1 838 – 1 842.
- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carriere Y, Dennehy TJ, Brown JK, Tabashnik BE, 2003. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 5 004 – 5 009.
- Pigott CR, Ellar D, 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 255 – 281.
- Rajagopal R, Sivakumar S, Agrawal N, Malhotra P, Bhatnagar RK, 2002. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. *J. Biol. Chem.*, 277: 46 849 – 46 851.
- Sangadala S, Walters FS, English LH, Adang MJ, 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal CryIA(c) toxin binding and 86Rb(+) - K<sup>+</sup> efflux *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 269: 10 088 – 10 092.
- Shang ZZ, Wang YS, Zou YH, 1979. Studies on successive mass rearing of the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker. *Acta Entomol. Sin.*, 22: 164 – 167. [尚稚珍, 王银淑, 邹永华, 1979. 二化螟饲养方法的研究. 昆虫学报, 22: 164 – 167]
- Sheng CF, Wang HT, Gao LD, Xuan WJ, 2003. The occurrence status, damage cost estimate and control strategies of stem borers in China. *Plant Prot.*, 29: 37 – 39. [盛承发, 王红托, 高留德, 宣维健, 2003. 我国水稻螟虫大发生现状、损失估计及防治对策. 植物保护, 29: 37 – 39]
- Tsuda Y, Nakatani F, Hashimoto K, Ikawa S, Matsuura C, Fukada T, Sugimoto K, Himeno M, 2003. Cytotoxic activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins on mammalian cells transfected with cadherin-like Cry receptor gene of *Bombyx mori* (silkworm). *Biochem. J.*, 369: 697 – 703.
- Vadlamudi RK, Weber E, Ji I, Ji TH, Bulla LA Jr, 1995. Cloning and expression of a receptor for an insecticidal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.*, 270: 5 490 – 5 494.
- Valaitis AP, Mazza A, Brousseau R, Masson L, 1997. Interaction analyses of *Bacillus thuringiensis* Cry1a toxins with two aminopeptidases from gypsy moth midgut brush border membranes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 529 – 539.
- Wolfersberger M, Luehty P, Maurer A, Parenti P, Sacchi FV, Giordana B, Honozet GM, 1987. Preparation and partial characterization of amino acid transporting brush border membrane vesicles from the larval midgut of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 86A: 301 – 308.
- Xu XJ, Yu LY, Wu YD, 2005. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71: 948 – 954.
- Yang YJ, Chen HY, Wu SW, Yang YH, Xu XJ, Wu YD, 2006. Identification and molecular detection of a deletion mutation responsible for a truncated cadherin of *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 735 – 740.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA Jr, 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 9 897 – 9 902.

(责任编辑:赵利辉)